

**Derivatives of kallikrein-trypsin inhibitor (BPTI), carrier-bound BPTI derivatives, their preparation and their use for preparing the enzymes trypsin, chymotrypsin and kallikrein in pure form**

**Publication number:** DE3135541

**Publication date:** 1983-03-24

**Inventor:** SCHUTT HERMANN DR (DE)

**Applicant:** BAYER AG (DE)

**Classification:**



**- international:** A61K35/39; A61K38/48; A61K38/55; C07K14/81; C12N9/64; C12N9/76; C12N9/99; A61K35/37; A61K38/43; A61K38/55; C07K14/81; C12N9/64; C12N9/76; C12N9/99; (IPC1-7): C07C103/52; C12N9/64; C12N9/76; C12N9/96

**- european:** C07K14/81B1A1; C12N9/64F2C21M34; C12N9/76

**Application number:** DE19813135541 19810908

**Priority number(s):** DE19813135541 19810908

**Also published as:**

 JP58055430 (A)  
 FR2512445 (A1)

**Report a data error here**

Abstract not available for DE3135541

Abstract of corresponding document: **FR2512445**

The invention relates to derivatives of kallikrein-trypsin inhibitor (basic pancreatic trypsin inhibitor/Kunitz BPTI), to carrier-bound BPTI derivatives, to their preparation and to their use for the purification by affinity chromatography of the enzymes trypsin, chymotrypsin and kallikrein.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑪ **DE 31 35 541 A 1**

⑤1 Int. Cl. 3:

**C 07 C 103/52**

C 12 N 9/76

C 12 N 9/64

C 12 N 9/96

⑳ Aktenzeichen:

P 31 35 541.2

㉑ Anmeldetag:

8. 9. 81

㉒ Offenlegungstag:

24. 3. 83

㉓ Anmelder:

Bayer AG, 5090 Leverkusen, DE

㉔ Erfinder:

Schutt, Hermann, Dr., 5600 Wuppertal, DE

*Benötigt Eigentum*

⑤4 **Kallikrein-Trypsin-Inhibitor-(BPTI)-Derivate, trägergebundene BPTI-Derivate, ihre Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung der reinen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein**

Die Erfindung betrifft Kallikrein-Trypsin-Inhibitor (basic pancreatic trypsin inhibitor/Kunitz-BPTI)-Derivate, trägergebundene BPTI-Derivate, ihre Herstellung und ihre Verwendung zur affinitätschromatographischen Reinigung der Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein. (31 35 541)

DE 3135541 A1

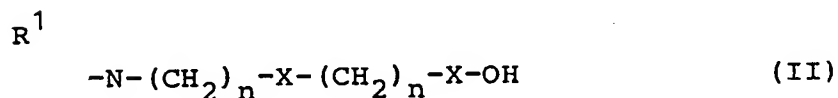
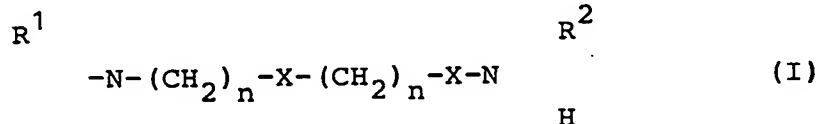
BEST AVAILABLE COPY

DE 3135541 A1

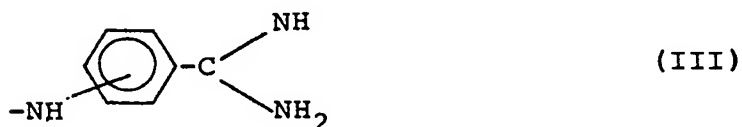
Patentansprüche

1. Kallikrein-Trypsin-Inhibitor-Derivate (BPTI-Derivate),  
dadurch gekennzeichnet, daß sie

- a) an der terminalen Aminogruppe und/oder an  
einer, an mehreren oder an allen vier  $\epsilon$ -Amino-  
gruppe(n) der Lysinreste reversible Aminoschutz-  
gruppen aufweisen und
- b) an den  $\beta$ -Carboxylgruppen des Asparaginsäure,  
den  $\gamma$ -Carboxylgruppen der Glutaminsäure sowie an  
der Carboxylgruppe am terminalen Alanin-58  
über eine Carbonamidbindung Reste der Formeln



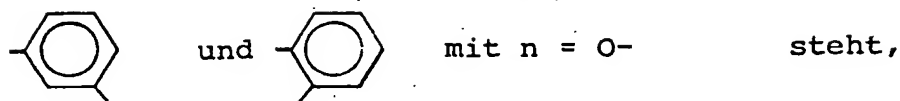
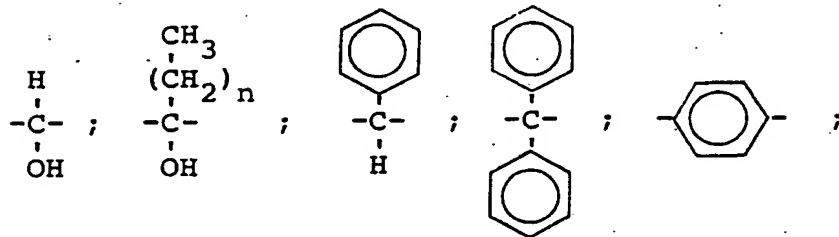
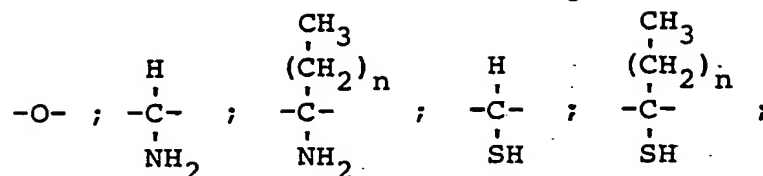
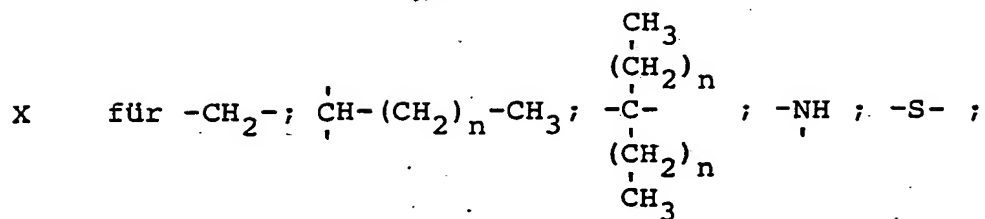
und



tragen, in denen

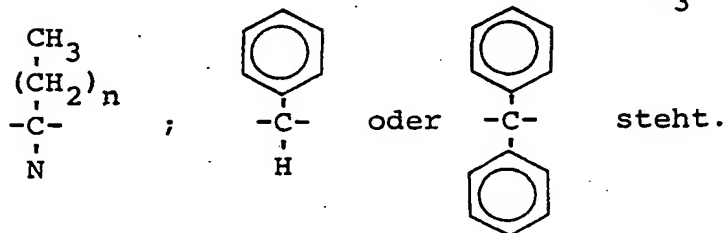
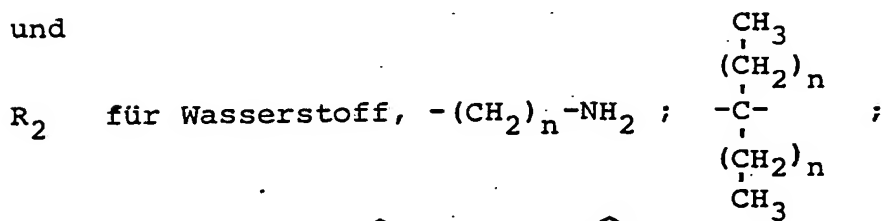
00-00-01

2

~~-18-~~

$R_1$  Wasserstoff,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -Alkyl oder C -C -Aryl bedeutet

und



08-09-81  
3  
- 11 -

2. BPTI-Derivate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die terminale Aminogruppe und die  $\epsilon$ -Aminogruppe  
der Lysinreste durch tert.-Butyloxycarbonyl-, Carbo-  
benzoxym-, N-Formyl-, N-Trifluoracetyl-, N-Phthalyl-  
reste oder Schiff'schen Basen von Tricarbonylver-  
bindungen geschützt sind.
3. BPTI-Derivate nach Anspruch 1, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die Lysinreste durch Reaktion mit  
O-Methylisoharnstoff oder S-Methylisothioharnstoff  
modifiziert sind.
4. BPTI-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 3, in denen  
der Lysin-15 Rest durch reversible Aminoschutz-  
gruppen geschützt ist.
5. BPTI-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 4, adsor-  
biert an Kationenaustauscher oder kovalent über  
die Reste der Formeln I, II und III an unlösliche  
Träger gebunden.
6. BPTI-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 4, adsor-  
biert an Kationenaustauscher und quervernetzt.
7. BPTI-Derivate nach den Ansprüchen 1 bis 4, kovalent  
über die Reste der Formeln I, II und III an  
Sepharose <sup>(R)</sup> der Firma Pharmacia Fine Chemicals,  
Upsala, Schweden oder an Cellulose oder deren  
Derivate gebunden.

08.09.81

- 48 -  
4

8. Aminoschutzgruppenfreie BPTI-Derivate nach den Ansprüchen 5 bis 7.
9. Verfahren zur Herstellung von trägergebundenen BPTI-Derivaten, dadurch gekennzeichnet, daß man
- 5 a) die terminale Aminogruppe und/oder eine, mehrere oder alle  $\epsilon$ -Aminogruppe(n) der Lysinreste durch Aminoschutzgruppen schützt,
- b) die  $\beta$ -Carboxylgruppen der Asparaginsäure, die  $\gamma$ -Carboxylgruppen der Glutaminsäure sowie die
- 10 Carboxylgruppe am terminalen Alanin-58-Rest mit nucleophilen Diaminen oder Aminoalkoholen umsetzt,
- c) die Reaktionsprodukte an Reaktionenaustauscher adsorbiert und gegebenenfalls mit bifunktionellen
- 15 Verbindungen quervernetzt oder die Reaktionsprodukte über die nucleophilen Triaminreste oder Aminoalkoholreste kovalent an Träger bindet und
- d) die reversiblen Aminoschutzreste abspaltet.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man die  $\beta$ -Carboxygruppen der Asparaginsäure, die  $\gamma$ -Carboxylgruppe am terminalen Alanin-58-Rest mit nucleophilen Diaminen in Gegenwart von Carbodiimiden umsetzt.

00.00.01

5  
- 48 -

11. Verfahren zur Herstellung von trägergebundenen BPTI-Derivaten, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Aminogruppen- oder Hydroxygruppen-haltigen Träger umsetzt mit nucleophilen Diaminen oder Aminoalkoholen der in Anspruch 1 angegebenen Formeln, den so modifizierten Träger mit BPTI, dessen terminale Aminogruppen und/oder  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysin-Reste ganz oder teilweise durch Aminoschutzgruppen geschützt sind, über Carbonamidbindungen verknüpft und anschließend die Schutzgruppen abspaltet.
12. Verwendung von aminoschutzgruppenfreien, träger-adsorbierten oder trägergebundenen BPTI-Derivaten nach Anspruch 1 zur affinitätschromatographischen Reinigung der Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein.



00.09.81  
6

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

5090 Leverkusen, Bayerwerk

Zentralbereich

Patente, Marken und Lizenzen Ad-by-c

07. Sep. 1981

Kallikrein-Trypsin-Inhibitor-(BPTI)-Derivate, trägergebundene BPTI-Derivate, ihre Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung der reinen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein

---

Die Erfindung betrifft Kallikrein-Trypsin-Inhibitor (basic pancreatic trypsin inhibitor/Kunitz-BPTI)-Derivate, trägergebundene BPTI-Derivate, ihre Herstellung und ihre Verwendung zur affinitätschromatographischen Reinigung der Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein.

Die proteolytischen Enzyme Trypsin (EC 3.4.4.4.), Chymotrypsin A (EC 3.4.4.5.), Chymotrypsin B (EC 3.4.4.6.) und Kallikrein (EC 3.4.4.21.) werden aus tierischen Organen von Schwein und Rind, bevorzugt aus dem Pankreasorgan der genannten Tiere gewonnen.

Die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein werden für medizinische Zwecke eingesetzt. Trypsin und Chymotrypsin können nach der DE-OS 2 432 518 in trägergebundener Form als Fibrin-lösende Arzneimittel verwendet werden. Chymotrypsin findet ferner Einsatz in der Ophthalmologie zur Ablösung der Augenlinse bei Augenoperationen.

00-09-81

7

-A-

Beide Enzyme werden außerdem als analytische Reagenzien benutzt.

Das Enzym Kallikrein hat zahlreiche medizinische Anwendungsgebiete.

- 5 Kallikrein wird wegen seiner vasodilatorischen Eigenschaften vor allem bei peripheren Durchblutungsstörungen verwendet, z.B. bei Auftreten von Endangiitis obliterans, Arteriosclerosis obliterans und Morbus Raynaud sowie bei  
10 Brüchen und Wunden, z.B. dem Sudeck Syndrom, Verbrennungen sowie bei altersbedingten Durchblutungsstörungen.

Für die vorgenannten Verwendungszwecke werden sehr reine Enzyme benötigt.

- 15 Die Enzyme Trypsin und Chymotrypsin können bekanntlich nach der Vorschrift von M. Kunitz und J.H. Northrop, J. Gen. Physiol. 19 (1936), 91 ff. durch Kristallisation der inaktiven Zymogene mit anschließender Aktivierung sowie durch Ionenaustauscherchromatographie gewonnen werden.

- 20 Die genannten Verfahren sind jedoch unspezifisch und in der technischen Ausführung sehr aufwendig.

Das Enzym Kallikrein wurde bereits in einheitlicher Form aus vorgereinigten Extrakten des Schweinepankreas durch Chromatographie an Ionenaustauschersäulen er-

08.09.81

- 2 -

halten (C. Kutzbach und G. Schmidt-Kastner, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353 (1972, 1099-1106, DE-OS 2 154 556 und DE-OS 2 154 557).

Es sind jedoch ausgehend vom Organextrakt insgesamt  
5 5 Schritte zur Gewinnung des reinen Enzyms Kallikrein  
notwendig.

Aus wirtschaftlichen Erwägungen ist die in einem Isolierungsschritt verlaufende Gewinnung der Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein mittels trägergebundener  
10 Inhibitoren oder Enzyme (Affinitätschromatographie) den  
auf mehr oder weniger unspezifischen Wechselwirkungen  
beruhenden Ionenaustauscherschritten überlegen.

In der Literatur ist bereits eine Vielzahl von affinitätschromatographischen Verfahren zur einheitlichen  
15 Herstellung der proteolytischen Enzyme Trypsin,  
Chymotrypsin und Kallikrein beschrieben worden.

Ein Teil der affinitätschromatographischen Verfahren geht von der Immobilisierung des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (BPTI) aus, der mit den proteolytischen  
20 Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin  
in Abhängigkeit des angewandten pH Wertes reversibel  
einen Enzym-Inhibitor-Komplex bildet.

Der BPTI ist aufgrund seiner pH-, thermischen, proteolytischen und Lösungsmittel-Stabilität (B. Kassell, Methods  
25 in Enzymology 19 (1970), 844-852) verglichen mit anderen  
polyvalenten Inhibitoren, wie z.B. dem Soya-Bohnen-

00.09.81

9

-A-

Trypsin-Inhibitor, besonders zur Isolierung der proteolytischen Enzyme aus Organextrakten geeignet. Durch die Bildung an den BPTI ist das proteolytische Enzym weitgehend vor einer Inaktivierung geschützt.

- 5 Der BPTI ist ein aus Rinderorganen gewonnenes Polypeptid mit 58 Aminosäuren bekannter Primärstruktur. U.a. wegen seines hohen Preises sollte der BPTI zur Affinitätschromatographie von Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein in einer möglichst bindungsaktiven Form immobilisiert werden.
- 10

- Aus der Röntgenstrukturanalyse der kristallisierten Enzym-Inhibitor-Komplexe sind die an der Komplexbildung mit proteolytischen Enzymen beteiligten Aminosäurereste des BPTI bekannt. Essentiell für die Komplexbildung ist im BPTI vor allem der Lysin 15-Rest.
- 15 Außerdem sind zur Bindung von Proteasen die Cystein 14- und Cystein 38-Reste, der Alanin 16-Rest sowie die basischen Arginin 17- und Arginin 39-Reste des BPTI notwendig.

- 20 Besonders wichtig für die Komplexbildung mit proteolytischen Enzymen auf seiten des BPTI ist der Lysin 15-Rest, dessen chemische Modifizierung mit Bernstein-säure- und Maleinsäureanhydrid zu inaktivem Penta-Succinyl- und Penta-maleoyl-BPTI führt. Wird dagegen
- 25 der Trypsin-BPTI-Komplex in gleicher Weise modifiziert, so entsteht der hemmaktive Tetrasuccinyl-Inhibitor ( $N^{\alpha}$ -Arg<sup>1</sup>,  $N^{\epsilon}$  Lysin<sup>26</sup>,  $N^{\epsilon}$ -Lysin<sup>41</sup> und  $N^{\epsilon}$ -Lysin<sup>46</sup>).

09.09.81

- 10 -

5 Ebenfalls hemmaktiv sind die nach gleichem Schema her-  
gestellten Tetramaleoyl-Inhibitoren, Tetramaleoyl(15-  
Homoarginin)-Inhibitoren und der Tetramaleoyl (15-N -  
carbamyl)-Lysin-Inhibitor (H. Fritz, H. Schult, R. Meister  
und E. Werle, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350 (1969),  
1531-1540).

Weitere Informationen über die an der Komplexbildung be-  
teiligten Aminosäurereste wurden aus der Quervernetzung  
des Trypsin-BPTI-Komplexes mit Dimethyladipimat erhalten.

10 Die bisher bekanntgewordenen Ergebnisse besagen, daß der  
BPTI zur Affinitätschromatographie möglichst so immobi-  
lisiert werden sollte, daß das hemmaktive Zentrum mit  
dem Lysin 15-Rest für das proteolytische Enzym sterisch  
frei zugänglich sein sollte. Die Trägerfixierung von Pro-  
15 teinen mit Lysinresten im aktiven Zentrum ist jedoch  
ein generelles Problem der Proteinchemie, für das bisher  
noch keine befriedigende Lösung gefunden werden konnte.

Die erhaltenen Ergebnisse sind sinngemäß auf Proteine  
(Enzyme und Enzyminhibitoren) übertragbar, die einen  
20 Lysinrest im sogenannten aktiven Zentrum aufweisen.

Die überwiegende Anzahl der bisher bekanntgewordenen  
Kupplungsmethoden für Proteine ist auf die Fixierung  
der Proteine über die Lysin-Seitenketten ausgerichtet.  
Zur Immobilisierung von Polypeptiden sind von den  
25 natürlicher in Proteinen vorkommenden Aminosäuren außer  
den Lysinresten nich Cystein- und Tyrosin-Reste be-  
fähig.

00.00.01

M

- 8 -

Der BPTI enthält jedoch keine Cysteinreste. Cysteinreste sind im BPTI-Molekül lediglich in oxydierter Form als drei Cystinbrücken vorhanden. Die drei Cystinbrücken können jedoch nicht vollständig ohne Aktivitätsverlust des BPTI zu Cysteinresten reduziert werden. Andererseits führt die Immobilisierung von Proteinen über die Tyrosinreste bekanntermaßen nur zu einer sehr geringen gebundenen Proteinmenge. Beide alternativen Immobilisierungsmöglichkeiten kommen daher für den BPTI nicht in Betracht.

Bisher wurden zahlreiche Versuche unternommen, den BPTI kovalent an unlösliche Träger zu binden.

Der BPTI wurde nach D.A. Johnson und J. Travis, Anal. Biochem. 72 (1976), 573-576, G.J. Baugh und J. Travis, Biochemistry 15 (1976), 836-841, R. Geiger, W. Stuckstedte und H. Fritz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361 (1980), 1003-1016 sowie nach der DE-OS 2 363 201 an mit Bromcyan aktivierte hydroxylgruppenhaltige Träger kovalent gebunden und zur Affinitätschromatographie von proteolytischen Enzymen eingesetzt.

Ferner ist die kovalente Bindung des BPTI an Anhydridharze nach DE-OS 1 768 934 und H. Fritz, B. Brey, A. Schmal und E. Werle, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350 (1969), 617-625 sowie die kovalente Bindung des BPTI mittels wasserlöslicher Carbodiimide an Carboxylgruppen tragende Sepharose 4 B nach G. R. Geiger,

05.09.81

12

-X-

R. Mann und T. Bettels, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, (1977), 479-483, O. Ole-Moi Yoi, J. Spragg und K.F. Austen, J. Immunol. 121 (1978), 66-71, N.B. Oza und R. W. Ryan, Biochem. J. 171 (1978), 285-288, 5 N.B. Oza, V.M. Amin, R.K. McGregor, A.G. Scidi und D.A. Carretero, Biochem. Pharmacol. 25, (1976), 1607-1612, zum Zwecke der Affinitätschromatographie bekanntgeworden.

10 Von den vorher genannten Kupplungsverfahren für den BPTI ist bekannt, daß die Lysinreste des BPTI mit dem aktivierten Träger zu einem kovalenten BPTI-Derivate reagieren. Diese BPTI-Träger besitzen nur eine geringe Kapazität für die proteolytischen Enzyme, da bevorzugt der Lysin 15-Rest des BPTI mit dem aktivierten Träger reagiert.

15 Es wurden in Kenntnis dieses Problems auch Versuche unternommen, den Lysin 15-Rest des BPTI zu modifizieren sowie durch Komplexbildung mit einem proteolytischen Enzym während der Kupplung des BPTI an polymere aktivierte Träger selektiv zu schützen und damit 20 eine kovalente Bindung des BPTI über andere Aminosäureseitenketten als den Lysin 15-Rest zu erreichen.

So modifizierten B. Kassell und R.B. Chow, Biochemistry 5 (1966), 3449-3453, J. Chauvet und R. Acher, Biochem. Biophys. Res. Commun 27 (1967), 230-255, R. Haynes, 25 D.T. Otsuga und R.E. Feeney, Biochemistry 7 (1968) 2879-2885, G.F. Means und R.E. Feeney, Chemical Modification of Proteins (1971), 93-95, Holden Day Inc.,

00-00-01  
13  
-8-

San Francisco, die Lysinwerte des BPTI, insbesondere den Lysin 15-Rest, durch Guanidierung mit O- oder S-Methylisoharnstoff zu Homoargininresten. Der 15, 26, 41, 46-Tetrahomarginin-BPTI besitzt die Hemmaktivität des BPTI.

Die kovalente Bindung des BPTI-Derivates nach der Bromcyan- und Anhydrid-Methode kann jedoch nur noch über die  $\alpha$ -Aminogruppe des N-terminalen Arginin-Restes erfolgen. Die Kupplung des BPTI-Derivates über eine einzige kovalente Bindung an den polymeren Träger führt jedoch zu BPTI-Trägern vergleichsweise geringer Stabilität.

R. S. Temler und J. H. R. Kägi, Enzyme 22 (1977), 249-255, versuchten außerdem während der Kupplung des BPTI an polymere Träger durch Komplexbildung des BPTI mit einem proteolytischen Enzym den Lysin 15-Rest des BPTI selektiv zu schützen. Das genannte Verfahren ist jedoch technisch nicht durchführbar.

Die technisch besonders einfach durchführbare Adsorption von Proteinen mit anschließender Quervernetzung mittels bifunktioneller Reagenzien wurde für den BPTI bisher überhaupt nicht beschrieben.

Die Verwendung der Adsorptions-/Quervernetzungsmethode ist technisch besonders geeignet zur Herstellung von Biokatalysatoren.



08.09.81

114  
- 8 -

Bekannt geworden ist bisher lediglich die Herstellung löslicher Polymere des BPTI und ihre Verwendung als Arzneimittel nach der DE-OS 2 258 495.

- 5 Die Quervernetzung von Proteinen mit bifunktionellen Reagenzien, wie z.B. Glutardialdehyd oder Glyoxal, erfolgt durch Reaktion mit den Lysinresten des Proteins (F. Wold, Methods in Enzymology 11, 617 ff.).

- 10 Bei Verwendung des BPTI für diese Immobilisierungsmethode ist daher wiederum eine Inaktivierung des BPTI durch bevorzugte Reaktion des Lysin 15-Restes zu erwarten.

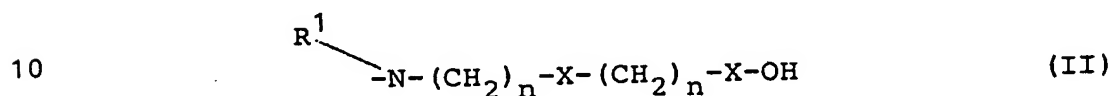
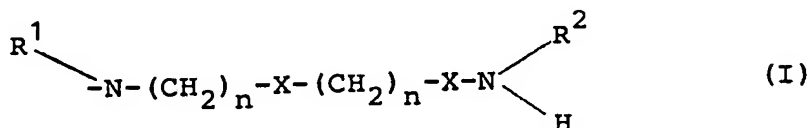
- Es wurde gefunden, daß Derivate des BPTI, deren  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste, besonders des Lysin 15-Restes, reversibel geschützt sind und die durch chemische Modifikation von Aminosäureresten neu eingeführte Amino- oder Hydroxylgruppen enthalten, nach kovalenter oder adsorptiver Bindung mit anschließender Quervernetzung durch bifunktionelle Reagenzien, 15 BPTI-Träger zur Affinitätschromatographie von Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein ergeben, die den bisher beschriebenen BPTI-Trägern an Kapazität für das 20 proteolytische Enzym überlegen sind.

- 25 Gegenstand der Erfindung sind daher Kallikrein-Trypsin-Inhibitor-Derivate (BPTI-Derivate), die

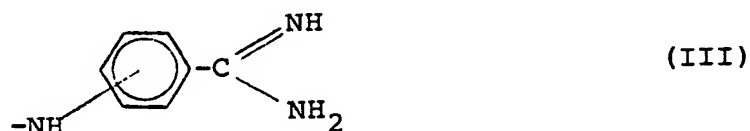
05.09.81

15  
- 10 -

- a) an der terminalen Aminogruppe und/oder an einer, an mehreren oder an allen vier  $\epsilon$ -Aminogruppe(n) der Lysinreste reversible Aminoschutzgruppen aufweisen und
- 5 b) an den  $\beta$ -Carboxylgruppen des Asparaginsäure, den  $\gamma$ -Carboxylgruppen der Glutaminsäure sowie an der Carboxylgruppe am terminalen Alanin-58 über eine Carbonamidbindung Reste der Formeln



und

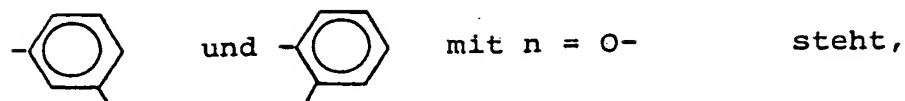
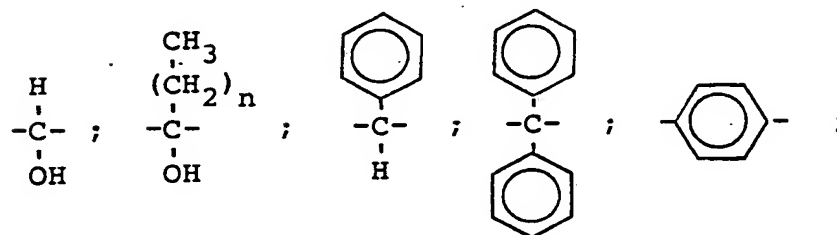
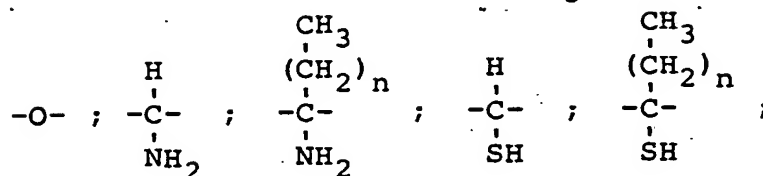
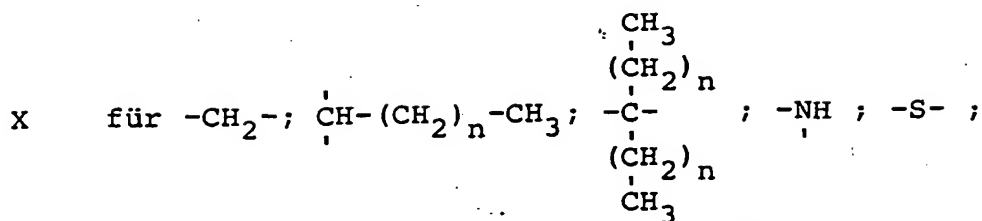


tragen, in denen

00.00.01

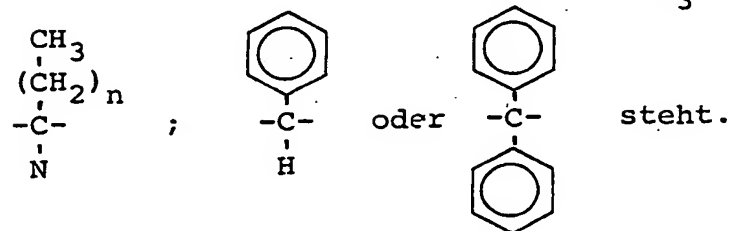
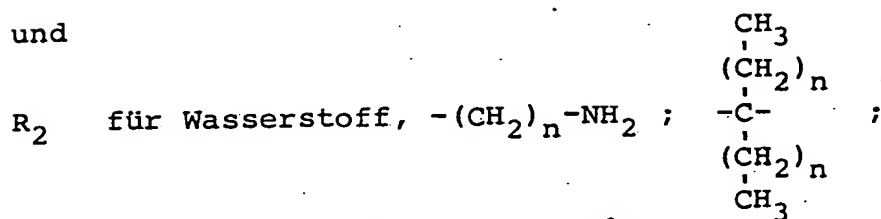
16

- 11 -



$R_1$  Wasserstoff,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -Alkyl oder C -C -Aryl bedeutet

und



17  
- 12 -

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind erfindungsgemäße BPTI-Derivate adsorbiert an Kationenaustauscher oder kovalent über die Reste der Formeln I, II und III an unlösliche Träger gebunden sowie die erfindungsgemäßen BPTI-Derivate adsorbiert an Kationenaustauscher und quervernetzt.

Die technischen Vorteile der BPTI-Träger sind Verwendung von weniger BPTI, konzentrierte Elution des proteolytischen Enzyms vom BPTI-Träger und aufgrund der geringeren immobilisierten BPTI-Menge geringe unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen.

Die neuen BPTI-Derivat-Träger können im Batch oder als Füllmaterial einer Säule zur Affinitätschromatographie von Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein eingesetzt werden. Im letzteren Fall kann das Verfahren automatisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Art der Herstellung der neuen BPTI-Derivate. Bisher wurden BPTI-Derivate ausschließlich durch Reaktion des gelösten BPTI hergestellt. Werden die BPTI-Derivate durch mehrfache chemische Modifizierung hergestellt, so müssen zwischen jedem Reaktionsschritt die überschüssigen Reagenzien vom BPTI-Derivat abgetrennt werden. Wegen des sehr basischen Charakters und des niedrigen Molekulargewichtes des BPTI bereitet dieser Vorgang durch Gelchromatographie oder Dialyse technische

DE-OS 2 116 377

18

- 13 -

Schwierigkeiten. In jedem Falle muß die BPTI-Derivat-Lösung nach jedem Modifizierungsschritt wieder konzentriert werden.

5 Erfindungsgemäß lassen sich BPTI-Derivate in technisch einfacher Weise nach Adsorption des BPTI an unlösliche Copolymerisate aus Styrol und Divinylbenzol nach der DE-OS 2 116 377 herstellen. Überraschenderweise kann der adsorbierte BPTI in gleicher Weise chemisch modifiziert werden wie der gelöste BPTI. Mit dem adsorbierten BPTI können nacheinander Sequenzen von chemischen  
10 Modifizierungen durchgeführt werden, ohne daß nach jedem Modifizierungsschritt eine Isolierung des BPTI-Derivates erforderlich ist.

15 Das weiter unten näher beschriebene erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von BPTI-Derivaten wird gegenüber der Reaktion in Lösung umso vorteilhafter, je mehr Modifizierungsschritte am BPTI-Molekül ausgeführt werden. Geeignete Träger für den BPTI sind die in der DE-OS 2 116 377 beschriebenen Copolymerisate  
20 sowie die als Amberlite XAD 2 bis 12 im Handel befindlichen Adsorptionsharze der Firma Röhm und Haas, Philadelphia, USA.

Die Modifizierungsreaktion am adsorbierten BPTI-Molekül ist in wäßriger Lösung bei pH-Werten von 2-12 durchzuführen. Bei Verwendung organischer Lösungsmittel zur BPTI-Derivatherstellung muß die Reaktionslösung durch  
25 Zusatz von Wasser oder wäßriger Salzlösung soweit ver-

000181

19  
- 14 -

5 dünn werden, daß das BPTI-Derivat am Träger adsorbiert bleibt. Das fertige BPTI-Derivat bzw. BPTI-Derivat-Zwischenstufen können zur Überprüfung der Reinheit mit Lösungsmitteln, wie z.B. Methanol, Ethanol, Iso-  
propanol oder ähnlichen Lösungsmitteln, in salzfreier Form eluiert werden.

10 Zur Verwendung als Arzneimittel wurden bereits Derivate des BPTI u.a. durch Anfügen von Aminosäureestern an die Carboxylenden des BPTI hergestellt (US-PS 3 953 417, US-PS 3 992 529, DE-OS 2 748 295, DE-OS 2 619 246, DE-OS 2 654 124, DE-OS 2 748 294, DE-OS 2 806 953, DE-OS 2 806 954). Diese BPTI-Derivate sind jedoch für das beschriebene Affinitätschromatographieverfahren nicht geeignet.

15 Der Reaktionsablauf zur erfindungsgemäßen Herstellung der aktiven, unlöslichen BPTI-Derivat-Trägerharze kann durch die folgenden Schemata verdeutlicht werden, wobei man davon ausgeht, daß der Lysin 15-Rest geschützt wird.

20 Adsorption der BPTI-Derivate an Kationenaustauscher mit anschließender Quervernetzung durch bifunktionelle Reagenzien

25 1. Einführung von (reversiblen) Aminoschutzgruppen in das BPTI-Molekül an der terminalen Aminogruppe und den vier Aminogruppen der Lysinreste,

08.09.81

- 20 -  
- 15 -

2. Einführung von Amino- und Hydroxylgruppen an den  $\beta$ -Carboxylgruppen von Asparaginsäure, sowie den  $\gamma$ -Carboxylgruppen von Glutaminsäure und an den terminalen Alanin-58-Rest.
  - 5 3. Adsorption des geschützten BPTI-Derivates an Kationenaustauscher,
  4. Vernetzung des adsorbierten, geschützten BPTI-Derivates mit bifunktionellen Reagenzien,
  5. Abspaltung der reversiblen Aminoschutzgruppen.
- 10 Kovalente Bindung der BPTI-Derivate an unlösliche Träger
1. Einführen von (Reversiblen) Aminoschutzgruppen in das BPTI-Molekül an der terminalen Aminogruppe und den vier Aminogruppen der Lysinreste
  - 15 2. Einführen von Amino- und Hydroxylgruppen an den  $\beta$ -Carboxylgruppen von Asparaginsäure und an den  $\gamma$ -Carboxylgruppen von Glutarsäure und der Carboxylgruppe des terminalen Alanin-58-Restes,
  3. kovalente Bindung der geschützten BPTI-Derivate über die neu in das BPTI-Molekül eingeführten Amino- und Hydroxylgruppen,
  - 20 4. Abspaltung der reversiblen Aminoschutzgruppen.

00-00-01  
21  
- 18 -

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch so durchgeführt werden, daß man einen Aminogruppen- oder Hydroxylgruppenhaltigen Träger umsetzt mit nucleophilen Diaminen oder Aminoalkoholen der in Anspruch 1 angegebenen Formeln, den so modifizierten Träger mit BPTI, dessen terminale Aminogruppen und/oder  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysin-Reste ganz oder teilweise durch Aminoschutzgruppen geschützt sind, über Carbonamidbindungen einknüpft und anschließend die Schutzgruppen abspaltet.

- 10 Eine dauerhafte Modifizierung der Lysinreste des BPTI zu Homoarginin-Resten wird durch Reaktion mit O-Methylisoharnstoff und S-Methylisothioharnstoff erreicht (R. Acher, J. Chauvet, R. Arnon und M. Sela, Eur. J. Biochem. 3 (1968), 476-482, B. Kassell et al. Biochemistry 5 (1963), 3449-3453) erzielt.

- 15 Als reversible Schutzgruppen für  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Aminogruppen können die aus der Peptidchemie bekannten, leicht abspaltbaren tert. Butyloxycarbonyl-, Carbobenzoxym-, N-Formyl-, N-Trifluorantyl- oder N-Phthalyl-Reste sowie Schiff'sche Basen mit Dicarbonylverbindungen, wie z.B. Acetylaceton, Acetessigester und O-Hydroxybenzaldehyd, dienen (E. Dane und Mitarbeiter, Angewandte Chemie 74 (1962), 874, J. C. Sheehan und V. G. Grenda, J. Amer. Chem. Soc. 84 (1962), 2417) und für Benzyldehyd (M. Bergmann, H. Fusslin und L. Zervas. Ber. dtsch. chem. Ges. 53 (1925), 1043). Die Abspaltung der genannten Schutzgruppen erfolgt in alkalischer wäßriger Lösung vorzugsweise in Gegenwart tert. Amine.



08.09.81

22

- AT -

Durch Reaktion der Diamine mit bifunktionellen Reagenzien, wie z.B. mit Glutardialdehyd und nochmalige Umsetzung mit Diamin, können polyaminhaltige BPTI-Derivate hergestellt werden.

- 5 Die Umsetzung von BPTI mit Carbodiimiden und nucleophilen Aminoverbindungen wird vorzugsweise bei pH-Werten zwischen 3 und 11, insbesondere zwischen pH 4 und pH 8 in wäßriger Lösung, die jedoch auch organische Lösungsmittel und/oder Salze und/oder Denaturierungsmittel enthalten kann, durchgeführt. Als gegebenenfalls
- 10 zusetzbare organische Lösungsmittel seien vorzugsweise genannt: Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Hexamethylphosphorsäuretriamid, Pyridin, Dimethylacetamid. Als Salze seien genannt: LiCl, NaCl und als Denaturierungsmittel: Guanidin-Hydrochlorid, Harnstoff.
- 15 Als Carbodiimide können bei der erfindungsgemäßen Umsetzung zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen eine Reihe von organischen Carbodiimiden eingesetzt werden, insbesondere folgende Carbodiimide haben
- 20 sich als für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besonders geeignet herausgestellt: Dicyclohexylcarbodiimid, N-Cyclohexyl-N'-(2-(4-morpholinyl)-ethyl)-carbodiimidmetho-toluol-4-sulfonat, N-Ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid-hydrochlorid,
- 25 N-tert.-Butyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid, N-Cyclohexyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid, N-Isopropyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid, N-Cyclohexyl-N'-(3-dimethyl-

- 18 - <sup>23</sup>

aminopropyl)-carbodiimid-metho-toluol-4-sulfonat, N,N'-Di-isopropyl-carbodiimid, N,N'-Di-para-tolyl-carbodiimid.

Die erfindungsgemäße Umsetzung erfolgt bevorzugt bei Temperaturen zwischen -20° und +50°C, insbesondere 0°C und 30°C.

5

Pro Mol BPTI bzw. BPTI-Derivat werden 10-100 ml Mol vorzugsweise 10 bis 25 Mol, der nucleophilen Amino-  
verbindung eingesetzt. Bezogen auf die nucleophile  
Aminoverbindung wird das verwendete Carbodiimid im  
10 Unterschuß eingesetzt.

Der Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazol (W. König und R. Geiger, Chem. Berichte, 103 (1970), 788-798) oder N-Hydroxysuccinimid erhöht die Ausbeute an BPTI-Polyamid, durch Verhinderung der Bildung von N-Acylharnstoffen.

- 15 Es bestehen aber auch Möglichkeiten zur Aktivierung der 5 Carboxylgruppen von Boc-BPTI ohne Verwendung von Carbodiimiden (S.R.B. Woodward, R.A. Olofson und H. Meyer, Journal of Amer. Chemical Society, 83, (1961) 1010 ff.). Die Aktivierung der 5 Carboxyl-  
20 gruppen kann auch über ein gemischtes Kohlensäureanhydrid mit N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-Dihydrochinolin nach B. Belleau und G. Malick, Journal of American Chemical Society, 90 (1968), 1651 oder mit Chlorkohlensäureethylester erfolgen.

00.00.01

24

- 49 -

Bei den Umsetzungen resultierende Gemische können gegebenenfalls nach an sich bekannten Verfahren, z.B. durch Elektrophorese, Gelfiltration oder Ionenaustauschchromatographie fraktioniert werden.

- 5 Als Träger für die kovalente Bindung der BPTI-Derivate kommen Hydroxyl- und Aminogruppen-haltige polymere Träger, wie z.B. Sepharose<sup>(R)</sup>, Sephadex<sup>(R)</sup> der Firma Pharmacia Fine Chemicals, sowie Cellulose und deren Derivate in Frage. Die Aktivierung der polymeren Träger  
10 erfolgt nach Literatur-bekannten Verfahren.

- Für die Adsorption der sauren BPTI-Derivate kommen Diaminoethyl-Gruppen-tragende hydroxylhaltige Polymere, wie z.B. DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex<sup>(R)</sup>, DEAE-Sepharose<sup>(R)</sup> und DEAE-Sepharose<sup>(R)</sup> mit anschließender  
15 der Quervernetzung durch Glutardialdehyd in Betracht.

- Für die Adsorption der basischen BPTI-Derivate kommen Carboxymethyl-Gruppen-tragende hydroxylhaltige Polymere, wie z.B. CM-Cellulose, CM-Sephadex<sup>(R)</sup> und CM-Sepharose<sup>(R)</sup>, mit anschließender Quervernetzung durch  
20 Glutardialdehyd in Betracht. Die zur Isolierung von Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein benötigten Organextrakte werden nach an sich bekannten Verfahren hergestellt.

- Das zerkleinerte Organ, z.B. Pankreas vom Schwein für  
25 die Gewinnung von Trypsin und Kallikrein sowie Pankreas

25  
- 28 -

vom Rind für die Gewinnung von Chymotrypsin, wird mit organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Trichlorethylen, entfettet. Die wäßrige Phase wird zur Gewinnung von Trypsin und Chymotrypsin auf einen pH-Wert von 1-2  
5 angesäuert. Ausgefallenes Protein wird abgesaugt oder abzentrifugiert. Vor dem Auftrag des Organextraktes auf den BPTI-Derivat-Träger wird Trypsinogen bei einem pH-Wert von 7-8 zu Trypsin aktiviert.

10 Zur Affinitätschromatographie von Trypsin wird der Organextrakt mit dem BPTI-Derivat-Träger bei pH-Werten von 5-8 in Kontakt gebracht. Fremdproteine werden bei gleichen pH-Werten aus dem BPTI-Derivat-Träger ausgewaschen und Trypsin bei pH-Werten von 1-2, z.B. mit 0,1 N HCl, in reiner Form von BPTI-Derivat-Träger  
15 eluiert.

Zur Gewinnung von reinem Chymotrypsin werden in gleicher Weise wie oben beschrieben Trypsin-freie Organextrakte eingesetzt. Das Enzym Kallikrein kann ausschließlich aus Schweinepankreas gewonnen werden.

20 Der Organextrakt wird wie folgt hergestellt:  
3,5 kg tiefgefrorener Schweinepankreas wird in einem Fleischwolf zerkleinert. Zu dem Organbrei werden 7 Ltr. Leitungswasser zugefügt und der pH-Wert mit Essigsäure auf pH 4,8 eingestellt. Zur Entfettung werden  
25 3,5 Ltr.  $\approx$  5 kg Trichlorethylen zugegeben und eine Stunde bei 25°C gerührt. Es werden 1 kg Filterhilfs-

B-00-01

26

- 21 -

mittel zugefügt und die Suspension 15 Minuten gerührt.  
Das Bindegewebe wird abgeschöpft und Reste über eine  
mit Kieselgur belegte Filterpresse entfernt. Die Tri-  
chloroethylen enthaltende untere Schicht wird abge-  
5 trennt, die wäßrige Phase mit 0,2 kg Kieselgur ver-  
setzt und die Lösung über Seitz AS-Filterplatten klar-  
filtriert. Die Organrohlösung enthält neben Kallikrein  
große Mengen an Trypsin und Chymotrypsin, die vor dem  
Auftrag auf eine BPTI-Derivat-Säule über DEAE-Cellulose  
10 entfernt werden müssen. Wie aus der Literatur bekannt,  
sind die Dissoziationskonstanten des Trypsin-BPTI-  
Komplexes kleiner als die des Kallikrein-BPTI-Kom-  
plexes, d.h. die Affinität von Trypsin zu BPTI ist  
größer als die von Kallikrein zu BPTI (M. Lazdunski,  
15 J.P. Vincent. H. Schweitz, M. Perron-Renner und J.  
Pudles, Proteinase-Inhibitors, Bayer-Symposium V.  
(1974) 420-431)

Vorreinigung des Organextraktes über DEAE-Cellulose  
zur Abtrennung von Trypsin- und Chymotrypsin-Aktivi-  
20 tät:

10 Ltr. Organextrakt werden durch Zugabe von entsalztem  
Wasser auf eine Leitfähigkeit  $4\text{mS} \times \text{cm}^{-1}$  verdünnt und  
der pH-Wert durch Zugabe von Natronlauge auf 7,0 ein-  
gestellt. Es werden 45 g vorgequollene DEAE-Cellulose  
25 (Cl-Form) zugefügt, 60 Minuten gerührt und abgefiltert  
oder abgeschleudert. Ablösen mit je  $3 \times 1$  Ltr. 0,05 M  
Phosphatpuffer pH 5,0 + 0,5 M NaCl 60 Min. Rühren bei

00-00-01

27

- 22 -

Raumtemperatur und Filtration über Seitz AS-Filter.  
Der pH-Wert wird mit Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt.

5 Der vorgereinigte Kallikrein-Extrakt wird bei einem  
pH-Wert von 6-8 mit dem BPTI-Derivat-Träger in Kontakt gebracht. Fremdproteine werden bei gleichem  
pH-Wert aus dem BPTI-Derivat-Träger ausgewaschen.

10 Reines Kallikrein wird bei pH-Werten von 5-4,5 vom  
BPTI-Derivat-Träger eluiert und sofort mit Ammoniak  
auf pH 6,0-6,5 eingestellt.

09.09.81

28

- 23 -

# I. Beispiele zur Herstellung der BPTI-Derivate

## Beispiel 1

Herstellung von inaktivem (1-arg-, 15, 26, 41, 46-Lys)-  
Penta-Boc-BPTI

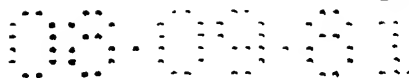
- 5 6,51 g lyophilisierter BPTI (1 m Mol,  $41,96 \times 10^6$  KIE  
(Kallikrein-Inhibitor-Einheiten) werden in 45 ml Dioxan-  
Wasser (2:1 volumetrisch) gelöst und unter Eiskühlung  
mit 10 ml 1 N NaOH und 1,2 g Di-tert. butyldicarbonat  
(5 m Mol) versetzt. Die Lösung wird 30 Minuten bei  
10 Raumtemperatur gerührt und mit Dioxan-Wasser (2:1) auf  
200 ml aufgefüllt.  
Restaktivität =  $0,441 \times 10^6$  KIE = 1,05 % der Ausgangs-  
aktivität.

- Herstellung von inaktivem (1-arg-, 15, 26, 41, 46-Lys)  
15 Penta-boc-BPTI (3,50- $\beta$ -Asp-1,6-diaminohexan, 7,49- -glu-  
1,6-diaminohexan-58-Ala-1,6-diaminohexan-)BPTI

- 100 ml der obigen Lösung werden mit 1,16 g Hexamethylen-  
diamin (10 m Mol, eingestellt mit HCl auf pH 4,5) und  
2,4 g EDC (12,5 m Mol) 24 Std. bei Raumtemperatur  
20 und pH 4,5 gerührt.

## Isolierung:

Methode A: Adsorption des BPTI-Derivates aus der wäßrigen



29

- 24 -

Lösung an 1,5 Liter Lewapol Ca 9255, Elution des BPTI-Derivates von dem Adsorptionsharz mit 2 Litern Methanol, Einengen der methanolischen Lösung am Rotationsverdampfer mit anschließender Gefriertrocknung.

5 Ausbeute = 3,049 g  $\approx$  93,5 %.

Methode B: Die obige Lösung wird gefriergetrocknet, der Rückstand in 50 ml 50 %iger Essigsäure gelöst, und auf einer Sephadex G10 Säule (H = 90 cm, D = 2,5 cm) bei einem Durchfluß von 60 ml/h chromatographiert. Die  
10 Fraktionen 19-24 = 60 ml werden gefriergetrocknet.

Herstellung von 3,50-B-Asp-1,6-diaminohexan-7,49- -glu-1,6-diaminohexan-58-Ala-1,6-diaminohexan-BPTI

Der Lyophilisierte Rückstand wird in 50 ml wasserfreier Trifluoressigsäure zur Abspaltung der Boc-Gruppe gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur ge-  
15 rührt.

Nach Abdestillieren der Trifluoressigsäure wird der Rückstand in 25 ml 50 %iger Essigsäure aufgenommen und auf einer Sephadex G 50 coarse-Säule (H = 70 cm, D = 2,5 cm) bei einem Durchfluß von 75 ml/h chromatographiert. Das Eluat wird fraktioniert aufgefangen und  
20 nach der Transmission bei 280 nm in 2 Fraktionen aufgeteilt, mit  $\text{NH}_3$  neutralisiert und gefriergetrocknet.



08.09.81

30  
- 25 -

Abkürzungen: BoC-Rest. =  $\Sigma$ -ter.-Butyloxycarbonyl-Rest  
 EDC = N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-  
 carbodiimid-hydrochlorid  
 BPTI = Kallikrein-Trypsin-Inhibitor

- 5 Polymeranteil: Fraktionen 15-22 = 71 ml = 0,86 g  
 Lyopulver = (26,4 % vom Einsatz)  
 Monomeranteil: Fraktionen 23-35 = 130 ml = 2,36 g  
 Lyopulver = (72,5 % vom Einsatz)  
 Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
 10 Tabelle 1.

### Beispiel 2

Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-2,4,6-Triaminopyrimidin-7,49- $\gamma$ -  
 glu-2,4,6-triaminopyrimidin-58-Ala-2,4,6-triamino-  
 pyridin)-BPTI

- 15 Herstellung nach Beispiel 1.  
 Polymeranteil = 0,75 g = 23,3 % vom Einsatz  
 Monomeranteil = 1,59 g = 49,0 % vom Einsatz  
 Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
 Tabelle 1.

### 20 Beispiel 3

Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-2,6-diaminotoluol-7,49- $\gamma$ -  
 glu-2,6-diaminotoluol-58-Ala-2,6-diaminotoluol)-BPTI

31

- 26 -

Herstellung nach Beispiel 1.

Polymeranteil = 0,18 g = 5,4 % vom Einsatz

Monomeranteil = 3,26 g = 100 % vom Einsatz

Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in

5 Tabelle 1.

#### Beispiel 4

Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-3,3'-diaminobenzididn-, 7,  
49- $\gamma$ -glu-3,3'-diaminobenzididn-58-Ala-3,3'-diamino-  
benzididn-)BPTI

10 Herstellung nach Beispiel 1.

Polymeranteil = 1,02 g = 33,3 % vom Einsatz

Monomeranteil = 1,72 g = 52,5 % vom Einsatz

Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
Tabelle 1.

#### 15 Beispiel 5

Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-1,10-diaminodecan-7, 49- $\gamma$ -  
glu-1,10-diaminodecan-58-Ala-1,10-diaminodecan)-BPTI

Herstellung nach Beispiel 1.

Polymeranteil = 0,40 g = 12,3 % vom Einsatz

20 Monomeranteil = 11,0 g = 33,8 % vom Einsatz

Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
Tabelle 1.

08.09.81

Beispiel 6

Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-2,3-diaminopyridin-7, 49- $\gamma$ -  
glu-2,3-diaminopyridin-58-Ala-2,3-diaminopyridin)-BPTI

Herstellung nach Beispiel 1.

- 5 Polymeranteil = 0,52 g = 16 % vom Einsatz  
Monomeranteil = 1,24 g = 38 % vom Einsatz  
Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
Tabelle 1.

Beispiel 7

- 10 Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-1,2-diaminoethyl-7,49- $\gamma$ -  
glu-1,2-diaminoethyl-58-Ala-1,2-diaminoethyl)-BPTI

Herstellung nach Beispiel 1.

- Polymeranteil: 0,92 g = 28,3 % vom Einsatz  
Monomeranteil: 2,43 g = 74,6 % vom Einsatz  
15 Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
Tabelle 1.

Beispiel 8

Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-1,2-aminoethanol-7,49- $\gamma$ -  
glu-1,2-aminoethanol-58-Ala-1,2-aminoethanol)-BPTI

- 20 Herstellung nach Beispiel 1.  
Polymeranteil: 0,31 g = 9,5 % vom Einsatz  
Monomeranteil: 1,34 g = 41,2 % vom Einsatz

33  
- 28 -

Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
Tabelle 1.

#### Beispiel 9

5 Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-1,4-diaminobutan-7,49- $\gamma$ -  
glu-1,4-diaminobutan-58-Ala-1,4-diaminobutan)-BPTI

Herstellung nach Beispiel 1.

Polymeranteil: 0,33 g = 10,1 % vom Einsatz

Monomeranteil: 1,09 g = 33,5 % vom Einsatz

10 Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
Tabelle 1.

#### Beispiel 10

Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-tetraethylenpentamin-7,49-  
 $\gamma$ -glu-tetraethylenpentamin-58-Ala-tetraethylenpentamin)-  
BPTI

15 Herstellung nach Beispiel 1.

Polymeranteil: 0,14 g = 4,3 % vom Einsatz

Monomeranteil: 1,33 g = 41 % vom Einsatz

Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
Tabelle 1.

#### 20 Beispiel 11

Herstellung von (3,50- $\beta$ -Asp-trimethylhexamethylen-diamin-  
7,49  $\gamma$ -glu-trimethylhexamethylendiamin-58-Ala-trimethyl-  
hexamethylendiamin)-BPTI

Herstellung nach Beispiel 1.

Polymeranteil: 0,10 g = 3,1 % vom Einsatz

Monomeranteil: 0,86 g = 26,4 % vom Einsatz

5 Charakterisierung des monomeren BPTI-Derivates in  
Tabelle 1.

#### Beispiel 12

Herstellung von (15,26,41,46-homoarginin, 3,50-8-Asp-  
1,4-diaminobutan, 7,49-1,4-diaminobutan-58-Ala-1,4-  
diaminobutan)-BPTI

10 BPTI wird nach der Vorschrift von B. Kassell und  
R. B. Chow, Biochemistry 5 (1960), 3441-3453, J.  
Chavet und R. Acher, Arch. Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 27 (1967), 230-235, guanidiert.

15 Die Umsetzung des guanidierten BPTI mit 1,4-Diamino-  
butan in Gegenwart von EDC erfolgt wie in Beispiel 1  
angegeben.

II. Bindung der BPTI-Derivate an polymere Trägermaterialien

#### Beispiel 13

20 Kovalente Bindung des BPTI-Derivates nach Beispiel 1  
an mit Epichlorhydrin-aktivierte Sepharose 4 B

200 ml gequollene Sepharose 4 B<sup>(R)</sup> oder Sepharose Cl 6 B<sup>(R)</sup>

00.00.01

35

- 30 -

(Pharmacia AB, Uppsalla, Schweden) werden über eine Fritte abgesaugt, in 160 ml 1 N NaOH suspendiert und 2 Stunden mit 20 ml Epichlorhydrin bei genau + 60°C aktiviert. Die aktivierte Sepharose wird abgesaugt, auf  
5 der Fritte 2 mal mit je 1 Liter Wasser gewaschen, in 200 ml 0,1 N NaOH suspendiert und 1,45 g lyophilisierter, inaktiver (1-arg-15,26,41-46-Lys)-penta-boc-(3,50-β-Asp-1,6-diaminohexan-7,49-γ-glu-1,6-diaminohexan-58-Ala-1,6-diaminohexan)-BPTI zugefügt. Die  
10 Suspension wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt über eine Fritte filtriert; der Rückstand wird 2 mal mit je 1 Liter Wasser, 2 x 1 Liter 10 %iger NaCl-Lösung und wieder mit 2 x 1 Liter Wasser gewaschen.

15 Die BPTI-Sepharose 4 B wird über Nacht zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe bei Raumtemperatur in 0,1 N HCl gerührt.

Eingesetzte BPTI-Derivat-Aktivität:  $5,39 \times 10^6$  KIE-analoge Einheiten.

20 Aktivität im Filtrat =  $2,12 \times 10^6$  KIE-analoge Einheiten (nach Einstellung auf pH < 1 mit HCl)

Aktivität der (3,50-β-Asp-1,6-diaminohexan, 7,49-γ-glu-1,6-diaminohexan-58-Ala-1,6-diaminohexan)-BPTI-Sepharose 4 B =  $3,27 \times 10^6$  KIE-analoge Einheiten/

25 200 ml BPTI-Derivat-Sepharose 4 B.

Alternativ zum lyophilisierten BPTI-Derivat kann auch

die nach Beispiel 1 hergestellte BPTI-Derivat-Lösung ohne Isolierung des BPTI-Derivates in lyophilisierter Form zur Bindung an die aktivierte Sepharose 4 B eingesetzt werden.

5 Beispiel 14

Kovalente Bindung des BPTI-Derivates nach Beispiel 2 an mit Epichlorhydrin-aktivierte Sepharose 4 B

Die Ausführung der Bindung des BPTI-Derivates erfolgt analog Beispiel 13.

10 Beispiel 15

Kovalente Bindung des BPTI-Derivates nach Beispiel 5 an mit Epichlorhydrin-aktivierte Sepharose 4 B

Die Ausführung der Bindung des BPTI-Derivates erfolgt analog Beispiel 13.

15 Beispiel 16

Kovalente Bindung des BPTI-Derivates nach Beispiel 7 an mit Epichlorhydrin-aktivierter Sepharose 4 B

Die Ausführung der Bindung des BPTI-Derivates erfolgt analog Beispiel 15.

37

- 22 -

Einsatz BPTI-Derivat =  $5,66 \times 10^6$  KIE-analoge Einheiten.  
 Aktivität in Filtrat =  $2,45 \times 10^6$  KIE-analoge Einheiten  
 (nach Einstellung auf pH  $\leq 1$  mit HCl).

- 5 Aktivität der (3,50- $\beta$ -Asp-1,2-diaminoethan-, 7,49-  
 glu-1,2-diaminoethan-58-Ala-1,2-diaminoethan-)-BPTI-  
 Sepharose 4 B =  $3,21 \times 10^6$  KIE-analoge Einheiten/200 ml  
 BPTI-Derivat-Sepharose 4 B.

#### Beispiel 17

- 10 Kovalente Bindung des BPTI-Derivates nach Beispiel 8  
 an mit Epichlorhydrin-aktivierter Sepharose 4 B

Die Ausführung der Bindung des BPTI-Derivates erfolgt  
 analog Beispiel 13.

#### Beispiel 18

- 15 Kovalente Bindung des BPTI-Derivates nach Beispiel 1  
 an mit Cyanurchlorid-aktiverter Sepharose 4 B

- 20 200 ml sedimentierte Sepharose 4 B (R) wird 60 Minuten  
 in einer Mischung aus 100 ml destilliertem Wasser und  
 200 ml Dioxan bei pH 5,0 - 7,0 mit 10 g Cyanurchlorid  
 aktiviert. Die aktivierte Sepharose 4 B (R) wird ab-  
 gesaugt, auf der Nutsche mit Dioxan und destilliertem  
 Wasser gewaschen und als Suspension bei pH 7,0 - 8,0  
 unter Zusatz von 1,5 g BPTI-Derivat nach Beispiel 1  
 16 Stunden bei Raumtemperatur gekuppelt. Der fertige



00-00-01

38

- 38 -

BPTI-Derivat-Träger wird abgesaugt, auf der Nutsche mehrfach mit destilliertem Wasser, 10 %iger NaCl-Lösung und wieder Wasser gewaschen.

Das Filtrat enthält  $1,67 \times 10^6$  KIE-analoge-Einheiten.

5 Beispiel 19

Adsorptive Bindung des BPTI-Derivates nach Beispiel 1 an CM-Sepharose Cl 6 B mit anschließender Quervernetzung durch Glutardialdehyd

200 ml CM-Sepharose Cl 6 B <sup>(R)</sup> (Pharmacia AB, Uppsala/Schweden) Na<sup>+</sup>-Form werden zusammen mit 1,45 g lyophilisiertem, inaktivem (1-arg-, 15, 26, 41, 46-lys) penta-boc-

Die Ausführung der Bindung des BPTI-Derivates erfolgt analog Beispiel 13.

Beispiel 18

15 Kovalente Bindung des BPTI-Derivates nach Beispiel 1 an mit Cyanurchlorid-aktiverter Sepharose 4 B

200 ml sedimentierte Sepharose 4 B <sup>(R)</sup> wird 60 Minuten in einer Mischung aus 100 ml destilliertem Wasser und 200 ml Dioxan bei pH 5,0 - 7,0 mit 10 g Cyanurchlorid aktiviert. Die aktivierte Sepharose 4 B <sup>(R)</sup> wird abgesaugt, auf der Nutsche mit Dioxan und destilliertem Wasser gewaschen und als Suspension bei pH 7,0 - 8,0 unter Zusatz von 1,5 g BPTI-Derivat nach Beispiel 1 16 Stunden bei Raumtemperatur gekuppelt. Der fertige

- 34 -  
39

Aktivität in Filtrat: < 12.500 KIE-analoge Einheiten  
≅ 0,2 % (nach Einstellung auf pH < 1 mit HCl).

#### Beispiel 20

5      Adsorptive Bindung des BPTI-Derivates nach Beispiel 7  
an CM-Sepharose CL 6 B mit anschließender Querver-  
netzung durch Glutardialdehyd

Die Adsorption und Quervernetzung des BPTI-Derivates  
erfolgt wie in Beispiel 21 angegeben.

10      Eingesetzt werden 1,45 g lyophilisierter, inaktiver  
(1-arg-, 15, 26, 41, 46-Lys) penta-boc-(3, 50-β-Asp-1, 2-  
diaminoethyl-7, 49-γ-glu-1, 2-diaminoethyl-58-Ala-  
1, 2-diaminoethyl)-BPTI, der wie in Beispiel 19 quanti-  
tativ an CM-Sepharose CL 6 B gebunden wird.

15      Aktivität im Filtrat: < 12.500 KIE-analoge Einheiten  
(nach Einstellung auf pH < 1 mit HCl).

III. Einsatz der BPTI-Derivat-Träger zur Gewinnung der  
reinen proteolytischen Enzyme Chymotrypsin, Kallikrein  
und Trypsin nach dem Prinzip der Affinitätschromato-  
graphie

#### 20      Beispiel 21

Gewinnung von Chymotrypsin mit BPTI-Derivat-Sepharose  
nach Beispiel 13

08.09.81

40  
- 25 -

180 ml BPTI-Derivat-Sephrose 4 B, hergestellt nach Beispiel 15, werden in 0,1 M Natriumacetatpuffer + 0,6 M NaCl + 0,05 M CaCl<sub>2</sub> pH 5,0 suspendiert und in eine Säule mit den Abmessungen Höhe = 6,2 cm, Breite = 6,1 cm eingefüllt.

1 g partiell gereinigtes Chymotrypsin aus Rinderpankreas (155 ATEE Einheiten/g) wird in 40 ml des vorher genannten Puffers gelöst und mit einer Geschwindigkeit von 250 ml/Std. auf die BPTI-Derivat-Sephrose 4 B-Säule aufgetragen.

Nicht adsorbierte Verunreinigungen werden mit 0,1 M Natriumacetatpuffer + 0,6 M NaCl + 0,05 M CaCl pH 5,0 vom Säulenmaterial eluiert, bis die Extinktion bei 280 nm den Ausgangswert erreicht hat.

15 Reines Chymotrypsin wird von der BPTI-Derivat-Sephrose 4 B-Säule mit 0,1 N HCl eluiert und kann nach Dialyse gegen destilliertes Wasser als lyophilisiertes Protein erhalten werden.

20 Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2 wieder.

#### Beispiel 22

Gewinnung von Chymotrypsin mit BPTI-Derivat-Sephrose nach Beispiel 16

41  
- 26 -

Die Durchführung erfolgt analog Beispiel 21. Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2 wieder.

### Beispiel 23

5 Gewinnung von Kallikrein mit BPTI-Derivat-Sepharose nach Beispiel 13

20 3 g partiell gereinigtes Trypsin-freies Kallikrein aus Schweinepankreas (32,4 Kallikrein (KE)-Einheiten/mg) werden in 210 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst und mit einer Geschwindigkeit von 300 ml/Stunde auf die BPTI-Derivat-Säule aufgetragen (Höhe = 4,5 cm, Durchmesser = 3,8 cm). Verunreinigungen werden mit 0,05 M Phosphatpuffer + 0,5 M NaCl pH 7,0 und 0,2 M Natriumacetat pH 6,0 solange ausgewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm wieder den Ausgangswert erreicht.

25 Kallikrein-Aktivität wird von der BPTI-Derivat-Sepharose 4 B-Säule mit 0,3 M Natriumacetatpuffer pH 4,4 eluiert und sofort mit konzentrierter Ammoniak-Lösung auf pH 6,0 eingestellt. Durch Dialyse und Gefriertrocknung kann reines Kallikrein gewonnen werden. Das Ergebnis  
30 der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2 wieder.

### Beispiel 24

Gewinnung von Kallikrein mit BPTI-Derivat-Sepharose nach Beispiel 14

08.09.81

42  
- 37 -

Die Aufarbeitung von partiell gereinigtem Kallikrein zu Rein-Kallikrein erfolgt wie im Beispiel 23 angegeben. Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2 wieder.

5 Beispiel 25

Gewinnung von Kallikrein mit BPTI-Derivat-Sepharose nach Beispiel 15

- Die Aufarbeitung von partiell gereinigtem Kallikrein zu Rein-Kallikrein erfolgt wie im Beispiel 23 angegeben.  
10 Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2 wieder.

Beispiel 26

Gewinnung von Kallikrein mit BPTI-Derivat-Sepharose nach Beispiel 16

- 15 Die Aufarbeitung von partiell gereinigtem Kallikrein zu Rein-Kallikrein erfolgt wie im Beispiel 23 angegeben. Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2 wieder.

Beispiel 27

- 20 Gewinnung von Kallikrein mit BPTI-Derivat-Sepharose nach Beispiel 17

43  
- 38 -

Die Aufarbeitung von partiell gereinigtem Kallikrein zu Rein-Kallikrein erfolgt wie im Beispiel 23 angegeben. Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2 wieder.

5 Beispiel 28

Gewinnung von Trypsin mit BPTI-Derivat-Sepharose nach Beispiel 15

172 ml BPTI-Derivat-Sepharose 4 B nach Beispiel 15 werden in 0,1 M Natriumacetatpuffer + 0,6 M NaCl +  
10 0,05 M  $\text{CaCl}_2$  pH 5,0 suspendiert und in eine Säule mit den Abmessungen Höhe = 5,7 cm und Durchmesser = 6,2 cm gefüllt.

2,5 g partiell gereinigtes Trypsin aus Schweinepankreas (20 FIP-Einheiten/mg) werden in ca. 50 ml des obenge-  
15 nannten Puffers gelöst mit einer Geschwindigkeit von 300 ml/Std. auf die BPTI-Derivat-Sepharose 4 B-Säule aufgetragen. Verunreinigungen werden mit 0,1 M Natriumacetatpuffer + 0,6 M NaCl + 0,05 M  $\text{CaCl}_2$  pH 5,0 so-  
lange ausgewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm wieder  
20 den Ausgangswert erreicht hat.

Trypsin-Aktivität wird von der BPTI-Derivat-Sepharose 4 B-Säule mit 0,1 N HCl eluiert.

Durch Dialyse und Gefriertrocknung kann reines Trypsin gewonnen werden.

25 Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2 wieder.

08.09.81

44

- 35 -

Beispiel 29

Gewinnung von Trypsin mit BPTI-Derivat-Sepharose nach  
Beispiel 14

- 5 Die Aufarbeitung von partiell gereinigtem Trypsin zu  
reinem Trypsin erfolgt nach Beispiel 28.  
Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2  
wieder.

Beispiel 30

- 10 Gewinnung von Trypsin mit BPTI-Derivat-Sepharose nach  
Beispiel 15

Die Aufarbeitung von partiell gereinigtem Trypsin zu  
reinem Trypsin erfolgt nach Beispiel 28.  
Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2  
wieder.

15 Beispiel 31

Gewinnung von Trypsin mit BPTI-Derivat-Sepharose nach  
Beispiel 16

- 20 Die Aufarbeitung von partiell gereinigtem Trypsin zu  
reinem Trypsin erfolgt nach Beispiel 28.  
Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2  
wieder.

13.09.81

45

- 40 -

Beispiel 32

Gewinnung von Trypsin mit BPTI-Derivat-Sepharose nach  
Beispiel 17

- 5 Die Aufarbeitung von partiell gereinigtem Trypsin zu  
reinem Trypsin erfolgt nach Beispiel 28.  
Das Ergebnis der Kapazitätsbestimmung gibt Tabelle 2  
wieder.



Tabelle 1

## Basische BPTI-Derivate nach Beispielen 1-11

BPTI-Derivat nach Beispiel	Kovalent an die COOH-Gruppen des BPTI gekuppelte Polyamine	$[\alpha]_D^{25^\circ C}$ 578 nm	1	2	3	4	5
1	1,6-Diaminohexan	-71,4°	3720	3921	2298	0,46 %	1,9-1,5
2	2,4,6-Triaminopyrimidin	-87°	3578	3375	839	0,17 %	2,1-1,5
3	2,6-Diaminotoluol	-89,8°	3258	2013	1758	0,26 %	1,7-1,1
4	3,3'-Diaminobenzid	-59,8°	2611	2407	2049	0,74 %	1,7-1,0
5	1,10-Diaminodecan	-91,4°	3974	4719	3771	0,10 %	1,8-1,0
6	2,3-Diaminopyridin	-74,8°	3618	4266	2751	0,25 %	2,0-1,6
7	1,2-Diaminoethan	-96,4°	3904	2736	3150	0,65 %	2,0-1,6
8	2-Aminoethanol	-87,6°	4111	3936	2397	0,16 %	1,9-1,5
9	1,4-Diaminobutan	-93,2°	4083	4458	3087	0,02 %	1,8-1,3
10	Tetraethylenpentamin	-95,8°	4899	3047	3306	0,28 %	1,9-1,4
11	Trimethylhexamethylen-diamin	-78,2°	3385	3741	3093	0,57 %	1,7-1,0
BPTI	-	-121°	ca. 6400	ca. 6400	ca. 6400	-	1,0

47  
- 42 -

- \* c=1 in H<sub>2</sub>O
1. Trypsin-Hemmung in KIE-analogen Einheiten/mg
  2. Chymotrypsin-Hemmung in KIE-analogen Einheiten/mg
  3. Kallikrein-Hemmung in KIE-analogen Einheiten/mg
  - 5 4. Nitratasche
  5. Elektrophoretische Beweglichkeit in der Cellogel-  
elektrophorese in Pyridinacetatpuffer pH 6,05  
bezogen auf BPTI = 1,0

48  
- 43 -

Tabelle 2

Beladung von verschiedenen BPTI-Derivat-Sepharosen 4 B mit Chymotrypsin-, Trypsin- und Kallikrein-Lösungen

Beispiel	BPTI-Derivat-Sepharose 4 B nach Beispiel	Kapazität für reines Chymotrypsin bzw. Kallikrein bzw. Trypsin
a) Chymo- trypsin		
21	1,6-Diaminohexan (Beispiel 13)	514.000 ATEE-Einh./Ltr. BPTI-Derivat-Sepharose 4B
22	1,2-Diaminoethan (Beispiel 16) BPTI (Vergleich)	360.160 " 67.100
b) Kallikrein		
23	1,6-Diaminohexan (Beispiel 13)	1,32 x 10 <sup>6</sup> Kallikrein-Einh./Ltr. BPTI-Derivat-Sepharose 4B
24	2,4,6-Triaminopyrimidin (Beispiel 14)	1,36 x 10 <sup>6</sup> "
25	1,10-Diamonodecan (Beispiel 15)	1,30 x 10 <sup>6</sup> "
26	1,2-Diaminoethan (Beispiel 16)	0,68 x 10 <sup>6</sup> "
27	2-Aminoethanol (Beispiel 17) BPTI (Vergleich)	1,49 x 10 <sup>6</sup> " 0,37 x 10 <sup>6</sup> "

49  
- 44 -

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Beispiel	BPTI-Derivat-Sepharose 4 B nach Beispiel	Kapazität für reines Chymotrypsin bzw. Kallikrein bzw. Trypsin	
c) Trypsin		452.900 FIP-Einh./Ltr. BPTI-Derivat-Sepharose 4B	
28	1,6-Diaminohexan (Beispiel 13)	311.770	"
29	2,4,6-Triaminopyrimidin (Beispiel 14)		"
30	1,10-Diaminododecan (Beispiel 15)	310.000	"
31	1,2-Diaminoethan (Beispiel 16)	234.000	"
32	2-Aminoethanol (Beispiel 17)	282.000	"
	BPTI (Vergleich)	95.500	"

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTC)**